

OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO CITOTÓXICA INVITRO E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA IN SILICO DE DERIVADOS QUINOLINA-TIOSSEMICARBAZONA

Ana Karoline Ribeiro Novais¹

Cidla De Sousa Marinho²

João Pedro Pereira Gomes³

Cláudio Henrique Victor Porto⁴

Jamerson Ferreira De Oliveira⁵

RESUMO

A literatura aponta a promissora atividade antitumoral das tiossemicarbazonas associadas a quinolina, de tal modo essa estrutura tem se tornado objeto de estudo para a formulação de novas linhas de fármacos que apresentem maior eficácia e segurança em relação aos tratamentos convencionais para o câncer. Neste sentido, o estudo em questão objetiva o desenvolvimento de derivados tiossemicarbazonas e avaliação de seu potencial citotóxico in vitro e farmacocinético in silico. A metodologia utilizada para a formação das moléculas partiu de duas etapas de sínteses, inicialmente para a obtenção de duas tiossemicarbazidas a partir da síntese entre hidrazina e isotiocianato. As tiossemicarbazidas posteriormente reagiram com 4-quinolinacarbaldeído (reações distintas) formando os compostos LAQOF-TSC03 e LAQOF-TSC04, com rendimento de 65,70% e 68%. Os valores de citotoxicidade foram de 118 μ M para a molécula LAQOF-TSC03 e 32,9 μ M para a molécula LAQOF-TSC04. Além disso, os dois compostos se apresentaram favorável para uso oral de acordo com a regra de Lipinski, uma vez que apresentaram peso molecular igual a 306,38 g/mol, LogP 2,73, 2 doadores de ligação de hidrogênio e 2 aceptores de ligação de hidrogênio para a LAQOF-TSC03 e peso molecular 340,83 g/mol, LogP 3,07, 2 doadores de ligação de hidrogênio e 2 aceptores de ligação de hidrogênio para LAQOF-TSC04. Desta maneira, os resultados encontrados tornam as moléculas potenciais fármacos para o tratamento dessa doença. Entretanto, faz-se necessário ainda os estudos complementares para a confirmação dos resultados iniciais.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas; Quinolina; Antitumoral; Novos Fármacos.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde, Discente, karolinenovais@aluno.unilab.edu.br¹

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde, Discente, cidlamarinho1@gmail.com²

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde, Discente, joaopedropereiragomes.labjt@gmail.com³

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde, Discente, claudiohenriquevictorporto@gmail.com⁴

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde, Docente, jamerson@unilab.edu.br⁵

INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 patologias que mais afetam a população mundial com aumentos gradativos dos casos a cada ano, ele pode ser caracterizadas como o crescimento desordenado de células que levam a formação de tumores (INCA, 2021). Estudos qualitativos já apontam o prejuízo na qualidade sofrido pelos pacientes que necessitam recorrer aos tratamentos disponíveis na atualidade (BATISTA, 2015). Sendo que a quimioterapia é atualmente a linha de frente para o combate ao câncer (INCA, 2021). A quimioterapia tem eficiência comprovada, entretanto sua alta incidência de efeitos colaterais a curto e longo prazo é fruto dos grupos farmacológicos tóxicos presentes em sua composição que levam a alterações fisiológicas e bioquímicas no paciente (LACERDA, 2001). Desta maneira, tornam-se cada vez mais frequentes estudos que se baseiam na busca de novos tratamentos mais seguros, menos invasivos e de maior eficácia para essa doença. A busca por uma nova farmacologia levou aos estudos da atividade antitumoral das tiossemicarbazonas associadas a quinolina que apresentam promissora atividade antitumoral, graças a sua maior eficácia e segurança ao comparado com os tratamentos convencionais (OLIVEIRA et al. 2015; OLIVEIRA et al. 2017). Partindo dessa atividade já comprovada pela literatura, o estudo em questão baseia-se na obtenção de novas moléculas derivadas dessa estrutura que possa ser utilizada futuramente como uma alternativa de tratamento farmacológico.

OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver derivados tiossemicarbazonas, bem como avaliar seu potencial citotóxico in vitro e farmacocinético in silico.

Específicos:

- Realizar a síntese, elucidação estrutural e determinação das características físico-químicas dos novos derivados quinolina-tiossemicarbazonas;
- Avaliar a citotoxicidade in vitro dos novos derivados frente a linhagem J774 de macrófagos de camundongo;
- Investigar propriedades farmacocinéticas de biodisponibilidade oral in silico dos compostos obtidos.

METODOLOGIA

Inicialmente foi realizada a síntese dos compostos de interesse para o estudo. A síntese foi dividida em duas etapas, onde foram obtidas duas tiossemicarbazidas para serem utilizadas na etapa seguinte como reagente para a formação das tiossemicarbazonas. Para a formação das tiossemicarbazidas foi utilizada a hidrazina hidratada e o fenil- isotiocianato e 4-cloro-fenil-isotiocianato em uma proporção de 1:2. Como solvente foi utilizado o diclorometano (CH_2Cl_2). Os reagentes foram então adicionados a um balão de fundo redondo sob agitação magnética em temperatura ambiente por uma 1 hora. Com o fim da agitação, o produto passou pela filtração e foi lavado com n-hexano. Na segunda etapa, foi realizada a síntese das tiossemicarbazonas a partir das tiossemicarbazidas produzidas na etapa anterior e a 4-quinolinacarbaldeído em proporção de 1:1. Foi escolhido o etanol como solvente e foi utilizado o ácido acético como catalisador da reação. A reação se

processou sob agitação magnética sob refluxo, por 1 hora. O precipitado formado após a agitação passou por etapas de filtração e lavagem com etanol gelado gerando duas tiossemicarbazonas: LAQOF-TSC03 e LAQOF-TSC04. Os compostos formados passaram por etapas de caracterização estrutural, inicialmente por meio de ressonância magnética nuclear, tanto para a identificação dos diferentes tipos de hidrogênios presentes na estrutura do produto como também para identificação dos átomos de carbono. Em sequência foram realizadas as análises dos descritores físico-químicos por meio da plataforma on-line Swiss ADME com o objetivo de identificar se as moléculas se enquadram na regra de Lipinski e consequentemente se seriam apropriadas para o uso por via oral (análise in silico). Por fim, as moléculas passaram por ensaios de citotoxicidade in vitro para avaliação do potencial citotóxico em células normais. Para isso, macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 24 horas, para que os compostos pudessem ser adicionados em concentrações de 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM e mantidos por 48 horas. Em seguida, 20 μL da solução de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium, 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-difenil-tetrazolium bromide) foi adicionada a uma concentração de 5 mg/mL em tampão PBS (Solução Tamponada de Fosfato), e as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições de cultivo. O sobrenadante foi então retirado e os cristais de formazan foram solubilizados em 20 μL de DMSO. A leitura da absorbância dos cristais de formazan foi realizada através de leitor ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad), no comprimento de onda de 590 nm. A concentração capaz de causar 50% (CC50) de perda de viabilidade celular foi determinada por análise de regressão linear. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto LAQOF-TSC03 apresentou formação de precipitado amarelo, seu rendimento foi de 65,7% e ponto de fusão de 200°C , este foi o composto de maior rendimento, já o LAQOF-TSC04 formou um sólido verde com rendimento de 68% e ponto de fusão igual a 195°C . Esses valores mostraram rendimentos reacionais satisfatórios estando em uma faixa de valores de rendimento já encontrados na literatura para compostos derivados de tiossemicarbazonas substituídos (HARAGUCHI, 2008, VERÇOZA, 2009). No processo de obtenção da tiossemicarbazida com a hidrazina atuando como nucleófilo para unir-se ao isotiocianato. Esse tipo de reação tem por característica a formação um carbono instável que forma cinco ligações de tal modo que para que a estabilidade seja restaurada uma das ligações é desfeita (SOLOMONS, 2018). A determinação da ligação que seria desfeita foi fruto da deficiência de elétrons do carbono resultado da ligação com átomos mais eletronegativos. Ademais, o fato de a ligação em questão ser do tipo pi facilita o processo, à medida que esta tem maior facilidade de ser desfeita (SOLOMONS, 2018). Com a formação da nova ligação o nitrogênio anteriormente com carga formal zero passa por uma etapa de descentralização eletrônica passando a apresentar carga formal negativa. Essa característica adquirida pelo nitrogênio permite que ele realize um ataque intramolecular rompendo a ligação entre o hidrogênio e nitrogênio da hidrazida que até então apresentava carga formal positiva. Por meio dessa etapa o composto perde sua natureza iônica e passa a ser molecular, podendo ser utilizado nas etapas seguintes. No mecanismo para a obtenção da tiossemicarbazona onde foi necessário adicionar o aldeído em um meio ácido para que ocorresse um rearranjo molecular que permitisse a síntese com a tiossemicarbazida. Em seguida foi formada uma ligação entre o carbono e o nitrogênio gerando uma carga formal positiva no nitrogênio e a quebra da ligação pi entre o carbono e a hidroxila, o oxigênio da hidroxila foi liberado por um mecanismo de desidratação gerando um carbocátion, estrutura intermediária de alta reatividade (SOLOMONS, 2018). Uma ligação pi foi formada com o nitrogênio, e por fim para que o composto adquirisse características moleculares o catalisador

ácido foi reconstituído. Para a caracterização estrutural dos compostos sintetizados foi utilizada a ressonância magnética nuclear, uma técnica de espectroscopia baseada na interação da radiação eletromagnética com a matéria (BASHISTA, 2005). Como a reação de síntese entre a tiossemicarbazida e um aldeído aromático tem como característica a formação de uma imina, a primeira análise foi realizada para a verificação da presença do hidrogênio imínico ao qual teve o valor de deslocamento igual a 9,02 ppm para ambos os compostos sintetizados. Estudos anteriores encontraram valores aproximados, como no caso de Oliveira (2008) onde o valor foi de 9,93 ppm e Islam (2019) que teve deslocamento químico 9,43 ppm, confirmando a formação dos compostos planejados nesse estudo. Outro parâmetro analisado pela ressonância magnética nuclear foi a presença de carbono da tiocarbonila característico das tiossemicarbazonas, os quais tiveram valor de deslocamento de 176,44 ppm e 176,49 ppm. Semelhantes valores de deslocamento foram encontrados anteriormente, como nos estudos de Wang et. al. (2019), com deslocamento de 175,34 ppm ou ainda de Islam (2019) com valor de 176,10 ppm confirmando mais uma vez a formação dos compostos propostos neste estudo. Para que um fármaco seja apropriado para o uso por via oral, este deve obedecer a regra de Lipinski, à qual são analisadas quatro propriedades físico-químicas, sendo elas peso molecular, logP, número de doadores de ligação de hidrogênio e número de aceptores de ligação de hidrogênio (LIPINSKI, 2001). Para a molécula LAQOF-TSC03 os dados encontrados foram: peso molecular 306,38 g/mol, LogP 2,73, 2 doadores de ligação de hidrogênio e 2 aceptores de ligação de hidrogênio. Já para a molécula LAQOF-TSC04 os valores foram: peso molecular 340,83 g/mol, LogP 3,07, 2 doadores de ligação de hidrogênio e 2 aceptores de ligação de hidrogênio. De acordo com os valores propostos por Lipinski (≤ 5 doadores de ligações H, ≤ 10 aceptores de ligações H, massa molecular ≤ 500 g/mol e $MlogP \leq 4,15$). Os dois compostos apresentam potencial biodisponibilidade para a via oral, pois não violaram nenhum dos parâmetros estabelecidos pela regra. Essa regra é amplamente utilizada para determinar a adequação de novos fármacos à sua utilização por via oral como no caso de Matsa et al (2019), que faz a determinação de uma série de compostos derivados de semicarbazonas e tiossemicarbazonas com potencial atividade antimalárica por meio da regra dos 5, sendo todas elas aprovadas. Para a análise da citotoxicidade foi utilizada o teste de MTT, por meio dele é possível determinar a viabilidade das células por meio de uma reação enzimática. O composto LAQOF/TSC-03 apresentou como sendo o menos citotóxico em comparação com o LAQOF/TSC-04 uma vez que as concentrações de apresentação de IC₅₀ foram 118 e 32,9 μ M, respectivamente. Isso implica dizer que é necessário uma maior concentração para o LAQOF/TSC-03 apresentar efeito prejudicial às células normais. Os valores de citotoxicidade para a LAQOF/TSC-04 apresentam-se desfavoráveis ao serem comparados à literatura que aponta valores IC₅₀ >40 μ M para células normais humanas (WANG, et. al., 2017). Em contrapartida o composto LAQOF/TSC-03 mostrou-se com resultados bastantes satisfatórios em comparação com valores anteriores que não superaram a faixa de IC₅₀ de 78 μ M (WANG, et. al., 2017, OLIVEIRA et.al., 2008).

CONCLUSÕES

Em suma, as moléculas apresentam-se promissoras diante dos resultados obtidos pelos estudos computacionais realizados, tornam-se favoráveis à realização de estudos continuados que possam analisar de forma mais completa as características in vivo dos protótipos farmacológicos.

AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos a FUNCAP por ter fornecido a bolsa que tornou esse projeto possível, a UNILAB

pelo apoio ao desenvolvimento da ciência, ao laboratório de química orgânica em nome do professor doutor Jamerson Ferreira de Oliveira e aos meus colegas do grupo por terem contribuído para o projeto.

REFERÊNCIAS

BATHISTA, A. L. B. S. Princípios básicos de ressonância magnética nuclear do estado sólido. São Carlos, Brasil, 2005.

BATISTA, Delma Riane Rebouças; DE MATTOS, Magda; DA SILVA, Samara Frizzeira. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. Revista de Enfermagem da UFSM, v. 5, n. 3, p. 499-510, 2015.

C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug Deliv. Rev. 2001,

DE OLIVEIRA, Renata B. et al. Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. European journal of medicinal chemistry, v. 43, n. 9,

p. 1983-1988, 2008.

HARAGUCHI, Shirani Kaori. Síntese e avaliação anti-tripanosoma e citotóxica de benzaldeído-tiosemicarbazonas derivadas do ácido caurenóico. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER.O que é o câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em:

ISLAM, Muhammad et al. Synthesis and characterization of new thiosemicarbazones, as potent urease inhibitors: In vitro and in silico studies. Bioorganic chemistry, v. 87, p. 155-162, 2019.

KOWALSKA, Madalena; FIJAŁKOWSKI, Łukasz; NOWACZYK, Alija. Avaliação da atividade biológica de potenciais fármacos que atuam no sistema cardiovascular utilizando as Regras de Lipinski e Veber. Revista de Educação, Saúde e Esporte , v. 8, n. 12, pág. 184-191, 2018.

OLIVEIRA, J. F. et al. Synthesis of Thiophene-thiosemicarbazone derivatives and Evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 104, p. 148-156, 2015.

OLIVEIRA, J. F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. European Journal of Medicinal Chemistry , v. 136, p. 305-314, 2017.

Solomons, G.; Fryhle, C.; Química orgânica, 12a ed., LTC - Livros técnicos científicos Ed. S. A: Rio de



VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA

A Universidade pós-isolamento social: desafios, expectativas e perspectivas

Janeiro/RJ, 2018, vol. 1.

VERÇOZA, George Leonardo et al. Synthesis and antimicrobial activities of new 4-thiazolidones derived from formipyridine thiosemicarbazones. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1405-1410, 2009.